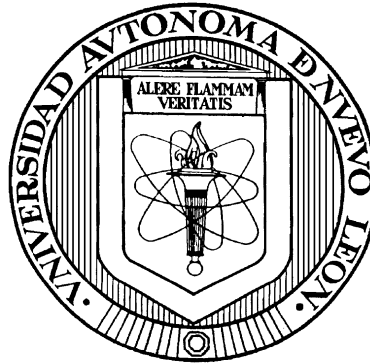


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**EVALUACIÓN DEL EFECTO CITOPÁTICO INDUCIDO POR UN  
ADENOVIRUS ONCOLÍTICO EN UNA LÍNEA CELULAR MURINA UTILIZADA  
COMO MODELO DE CÁNCER CERVICAL**

**Por**

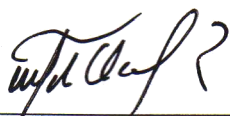
**MCP. Elvis Martínez Jaramillo**

**Como requisito parcial para obtener el título de  
MAESTRÍA EN CIENCIAS con Orientación en Morfología**

**SEPTIEMBRE 2015**

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO CITOPÁTICO INDUCIDO POR  
UN ADENOVIRUS ONCOLÍTICO EN UNA LÍNEA CELULAR  
MURINA UTILIZADA COMO MODELO DE CÁNCER  
CERVICAL”**

Aprobación de Tesis



---

Dr. C. Roberto Montes De Oca Luna  
Director



---

Dra. C. Odila Saucedo Cárdenas  
Codirector



---

Dra. C. María De Jesús Loera Arias  
Comisión de Tesis



---

Dr. med. Gerardo E. Muñoz Maldonado  
Subdirector de Estudios de Posgrado

Monterrey, Nuevo León

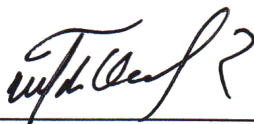
Septiembre de 2015

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO CITOPÁTICO INDUCIDO POR  
UN ADENOVIRUS ONCOLÍTICO EN UNA LÍNEA CELULAR  
MURINA UTILIZADA COMO MODELO DE CÁNCER  
CERVICAL”**

Presentado por

M.C.P. Elvis Martínez Jaramillo

El presente trabajo fue realizado en la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. bajo la dirección del Dr. Roberto Montes de Oca Luna y la Dra. Odila Saucedo Cárdenas y en el Departamento de Cirugía Hiram Polk Jr. MD en el edificio Kosair Charities Clinical Translational Research de la Escuela de Medicina de la Universidad de Louisville, KY, E.U.A. bajo la dirección del Dr. Jorge G. Gómez Gutiérrez.



---

Dr. C. Roberto Montes de Oca Luna  
Director



---

Dra. C. Odila Saucedo Cárdenas  
Codirector



---

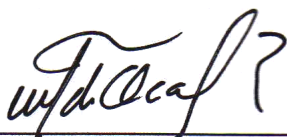
Dr. C. Jorge G. Gómez Gutiérrez  
Director externo

**“ASSESSMENT OF CYTOPATHIC EFFECT INDUCED BY  
AN ONCOLYTIC ADENOVIRUS ON A CELL LINE USED  
AS CERVICAL CANCER MODEL”**

Presented by

Elvis Martínez Jaramillo M.D.

This work was done in the College of Medicine of The Autonomous University of Nuevo Leon, in Mty, NL. México under direction of PhD Roberto Montes-de-Oca-Luna and Odila Saucedo-Cárdenas in the Surgery Department Hiram Polk Jr. MD in the Kosair Charities Clinical Translational Research Building of the School of Medicine of Louisville University, KY, USA under direction of PhD Jorge Gómez-Gutiérrez



---

Roberto Montes-de-Oca-Luna,  
PhD Director



---

Odila Saucedo-Cárdenas,  
PhD Codirector



---

Jorge Gómez-Gutiérrez,  
PhD External Director

Monterrey, Nuevo León

September 2015



## RESUMEN

MCP. Elvis Martínez Jaramillo

Fecha de Graduación: Septiembre 2015

Universidad Autónoma de Nuevo León  
Facultad de Medicina

Título:

**EVALUACIÓN DEL EFECTO CITOPÁTICO INDUCIDO  
POR UN ADENOVIRUS ONCOLÍTICO EN UNA LÍNEA CELULAR  
MURINA UTILIZADA COMO MODELO DE CÁNCER CERVICAL**

Número de páginas: 48

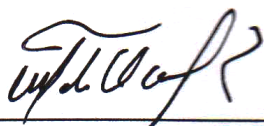
Candidato para el grado de  
**Maestría en Ciencias con  
Orientación en Morfología**

Área de Estudio: Morfología

**Propósito y Método del Estudio.** Los adenovirus oncolíticos ofrecen un tratamiento muy prometedor para combatir al cáncer. Estos virus se replican pobremente en células de ratón, por lo que para evaluar su eficacia para destruir tumores, usualmente se implantan células tumorales humanas en las cuales sí se replican los virus, pero con el inconveniente que se deben usar ratones inmunosuprimidos, para evitar que su sistema inmune elimine estas células por ser de diferente especie. Sin embargo, estos ratones no representan un modelo adecuado para evaluar la eficacia terapéutica de dichos adenovirus en ensayos preclínicos, ya que carecen de mecanismos de defensa propios del sistema inmune que pudiesen coadyuvar en la protección contra el tumor y/o eliminación del adenovirus. Actualmente no existe un modelo de cáncer de cérvix en ratones silvestres (inmunocompetentes) en los cuales los tumores se desarrollen a partir de células murinas y que los virus oncolíticos se repliquen eficientemente, al igual que en las células humanas, y se permita evaluar su efecto antitumoral.

Se ha demostrado que los genes E6 y E7 del HPV-16 facilitan la replicación de los adenovirus. En este trabajo por primera vez se evaluó la capacidad de replicación de un adenovirus oncolítico en la línea celular murina TC-1 la cual posee los genes E6 y E7 del HPV-16. Demostramos que el adenovirus oncolítico Adhz60 indujo en la línea TC-1 un efecto citopático evidente, disminuyó importantemente su viabilidad celular, indujo la expresión de proteínas virales tempranas y tardías, fue capaz de generar una progenie viral infectiva y de inducir apoptosis.

**Contribuciones y Conclusiones.** Con nuestros resultados demostramos que la línea celular murina TC-1 es permisiva para la replicación del virus oncolítico Adhz60. Por lo tanto, las células TC-1 pueden ser usadas como modelo tumoral para evaluar adenovirus oncolíticos en ratones inmunocompetentes.



---

**Dr. Roberto Montes de Oca Luna**  
Director de Tesis

## DEDICATORIA

---

*A Josefina Jaramillo Vargas, Raúl Banda Martínez, quienes me han apoyado enormemente, me dieron la vida y mi educación, siempre se han preocupado por mi, y quienes sin ellos no habría llegado aquí. A mis hermanos Brayant Martínez Jaramillo y Karisma Martínez Jaramillo por su apoyo y comprensión.*

## AGRADECIMIENTOS

---

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. Roberto Montes de Oca por todas las enseñanzas; por motivarme a buscar explicaciones de todos los procesos; por inclinar a este médico hacia una formación más científica y menos empírica y por darme la oportunidad de realizar mi estancia en Louisville.

A la Dra. Odila Saucedo Cárdenas y la Dra. María de Jesús Loera Arias por usar parte de las instalaciones del laboratorio, por sus enseñanzas durante mi formación, por formar parte del Comité de Tesis, por sus valiosas sugerencias e interés, en la revisión del presente trabajo.

Al Dr. Jorge Gómez-Gutiérrez por permitirme trabajar con él en Estados Unidos, por las enseñanzas, consejos y motivación que me brindó, por el enorme apoyo que recibí tanto de él como de su familia.

Al jefe del Departamento de Cirugía en la Universidad de Louisville, el Dr. Kelly McMasters por aceptarme en su laboratorio.

A mis amigos, compañeros y ex compañeros del laboratorio Leticia Elenes, Yessica Sánchez, José Juan Pérez, Rodolfo Garza, Sheila Cedillo, Alberto Barrón, Miguel Parga, Abigail Robles, Marcela Ramírez, Juan Antonio Castillo, Arnulfo Villanueva, David Martínez, Gabriel Figueroa e Iván Martínez por su amistad y todos los momentos agradables compartidos.

A los compañeros del laboratorio en Louisville Stephen Wechman y Mei Rao quienes me apoyaron durante mi estancia.

A todos los profesores y compañeros del programa de maestría en ciencias.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para la realización de mis estudios. A la Universidad Autónoma de Nuevo León y a la Universidad de Louisville.

# CONTENIDO TEMÁTICO

INDICE DE FIGURAS	IX
LISTA DE ABREVIATURAS	X
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES	3
2.1. VIRUS ONCOLÍTICOS	3
2.2. ADENOVIRUS	6
2.3. LÍNEAS CELULARES MURINAS	11
2.4. LÍNEA CELULAR TC-1	13
2.5. GENES E6 Y E7 DEL HPV16	13
2.6. JUSTIFICACIÓN Y ORIGINALIDAD DEL ESTUDIO	14
2.6. HIPÓTESIS	15
2.7. OBJETIVO GENERAL	15
2.8. OBJETIVOS PARTICULARES	15
CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS	16
3.1. PLAN DE TRABAJO	16
3.2. MATERIAL	17
3.3. MÉTODOS	19
3.3.1. EVALUACIÓN DE MORFOLOGÍA CELULAR	19
3.3.2. TINCIÓN CON CRISTAL VIOLETA	19
3.3.3. ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR CON MTT	20
3.3.4. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS E1A Y CASPASA 3 ACTIVADA	20
3.3.5. INMUNOCITOQUÍMICA PARA HEXÓN	21
3.3.6. CUANTIFICACIÓN DE PARTÍCULAS ADENOVIRALES	21
3.3.7. DETECCIÓN DE APOPTOSIS MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO.	23
3.3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	23
CAPÍTULO 4. RESULTADOS	24
4.1. ADENOVIRUS UTILIZADOS EN EL ESTUDIO.	24
4.2. LA LÍNEA CELULAR TC-1 MUESTRA EFECTO CITOPÁTICO	25
4.3. LAS CÉLULAS TC-1 SUFRE LISIS CELULAR	26
4.4. EL ADENOVIRUS ADHZ60 DISMINUYE LA VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS TC-1	27
4.5. LA LÍNEA CELULAR TC-1 PRODUCE LA PROTEÍNA TEMPRANA E1A	28
4.6. LAS CÉLULAS TC-1 PRODUCEN LA PROTEÍNA TARDÍA HEXÓN	29
4.7. LA LÍNEA CELULAR TC-1 PRODUCE PARTÍCULAS VIRALES INFECTIVAS	30
4.8. LAS CÉLULAS TC-1 SUFREN APOPTOSIS TARDÍA	31
4.9. EL ADHZ60 ACTIVA LA VÍA DE APOPTOSIS EN LAS CÉLULAS TC-1	32
CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN	33

## INDICE DE FIGURAS

---

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Infección por un adenovirus oncolítico con delección del gen E1B55K.	4
<b>Figura 2.</b> Estructura de un adenovirus.	6
<b>Figura 3.</b> Método de dilución de punto final TCID <sub>50</sub> .	7
<b>Figura 4.</b> Elementos que componen los adenovirus utilizados.	24
<b>Figura 5.</b> Morfología celular en las 3 líneas celulares infectadas con Adhz60.	25
<b>Figura 6.</b> Efecto de lisis producido en células TC-1 por los distintos adenovirus.	26
<b>Figura 7.</b> Viabilidad celular de las células TC-1 ante el Adhz60.	27
<b>Figura 8.</b> Expresión de la proteína temprana adenoviral E1A en la línea TC-1.	28
<b>Figura 9.</b> Expresión de la proteína tardía adenoviral hexón en la línea TC-1 infectada con el Adhz60.	29
<b>Figura 10.</b> Titulación de la producción de partículas adenovirales infectivas en células TC-1.	30
<b>Figura 11.</b> Cuantificación de apoptosis tardía en células TC-1 infectadas con Adhz60.	31
<b>Figura 12.</b> Expresión de caspasa 3 activada en las células TC-1 infectadas con Adhz60.	32

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

°C	Grados centígrados
aa	Aminoácido
Ad	Adenovirus
ADN	Ácido desoxirribonucleico
aprox	Aproximadamente
BSA	Albúmina de Suero Bovino
CaCu	Cáncer Cérvicouterino
CAR	Receptor Cocksackie Adenovirus
CPE	Efecto citopático (del inglés Cytopathic Effect)
CTL	Linfocitos T Citotóxicos
DAMPS	Patrones moleculares asociados a daño
ej	Ejemplo
FBS	Suero Fetal Bovino
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos (del Inglés Food and Drug Administration)
g	Gravedades
h	Hora (s)
HPV	Virus del Papiloma Humano
HRP	Peroxidasa de rábano (del inglés Horsedish Peroxidase)
IFN	Interferón
ifu	Unidad infectiva estándar
Kb	Kilo base
kDa	Kilo Dalton
mA	Miliamperes
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MOI	Multiplicidad de Infección

nm	Nanómetros
P.V.	Partículas virales
PAMPS	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS	Buffer Fosfato Salino
pRb	Proteína Retinoblastoma
PS	Penicilina y Estreptamicina
PVDF	Polivinilidenofluoruro
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucleico mensajero
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
seg	Segundos
μg	Microgramo
μL	Microlitro
μm	Micrómetro



# Capítulo 1. INTRODUCCIÓN

---

La terapia con virus oncolíticos ha dado buenos resultados en ensayos clínicos al administrarse en combinación con quimioterapia, aunque no es un tratamiento convencional contra el cáncer. Los adenovirus oncolíticos se replican deficientemente en células de ratón, por tal razón los estudios preclínicos realizados hasta el momento para probar la eficacia de estos virus se han llevado a cabo en tumores de células humanas implantadas en ratones inmunosuprimidos. Sin embargo, este modelo de ratón inmunosuprimido no es adecuado ya que no refleja la participación del sistema inmune, los efectos colaterales de la replicación y la biodistribución del virus, por lo que es necesario establecer un modelo inmunocompetente que ayude a evaluar todos estos aspectos. Actualmente no existe un modelo de cáncer de cérvix en ratones silvestres (inmunocompetente) en los cuales los tumores se desarrollen a partir de células murinas y que los virus oncolíticos se repliquen eficientemente, al igual que en las células humanas, y se permita evaluar su efecto antitumoral. Por otro lado, ya se ha reportado que los genes E6 y E7 del HPV-16 facilitan la replicación del adenovirus. En el presente trabajo, se evaluó la capacidad de replicación de un adenovirus oncolítico en la línea tumoral murina TC-1 que posee los genes E6 y E7 del HPV-16. Demostramos que la línea celular TC-1 es permisiva para la replicación del adenovirus oncolítico Adhz60 y es capaz de producir partículas adenovirales

infectivas. Estos resultados indican que es posible usar la línea celular murina TC-1 como modelo tumoral en ratones inmunocompetentes para evaluar la eficacia del tratamiento con adenovirus oncolíticos.

## Capítulo 2. ANTECEDENTES

---

### 2.1. VIRUS ONCOLÍTICOS

En 1912 se reportó la remisión de cáncer cervical después de la inmunización con el virus de la rabia y dio la primera evidencia de oncolisis viral. (Campbell and Gromeier, 2005). Posteriormente algunos reportes de casos documentaron la remisión de pacientes con cáncer que tenían asociación con alguna infección viral, como ocurrió en pacientes con Leucemia Linfocítica Crónica después de vacunarse con el virus de la viruela o en pacientes con Linfoma de Hodking después de infectarse con el virus del sarampión (Nemunaitis, 1999).

Algunos virus tienen la propensión de replicarse en células transformadas, esto debido a que cuentan con defectos específicos asociados al tumor que impiden la defensa normal contra el virus. A los virus oncolíticos también se les conoce como virus condicionalmente replicativos debido a que la maquinaria de replicación viral solo puede ser complementada en células tumorales

Los virus producen efectos citotóxicos con la finalidad de multiplicarse y propagar su progenie. Ésta capacidad para destruir células puede ser dirigida hacia células tumorales como una propiedad muy útil para el desarrollo de nuevos agentes antitumorales. Ésta es una característica importante de los virus oncolíticos, además de infectar y replicarse en células tumorales para

destruirlas, tienen la capacidad de no afectar a las células normales, o infectarlas en un grado no significativo.

La propuesta del desarrollo de vectores replicativos surge hace unas décadas al observar la baja cantidad de genes transferibles *in vivo* con plásmidos y virus no replicativos y la dificultad de macromoléculas como los anticuerpos monoclonales para penetrar tumores. Con el fin de aumentar la transducción en células tumorales, se decidió usar vectores replicativos (Gómez and Curiel, 2000).

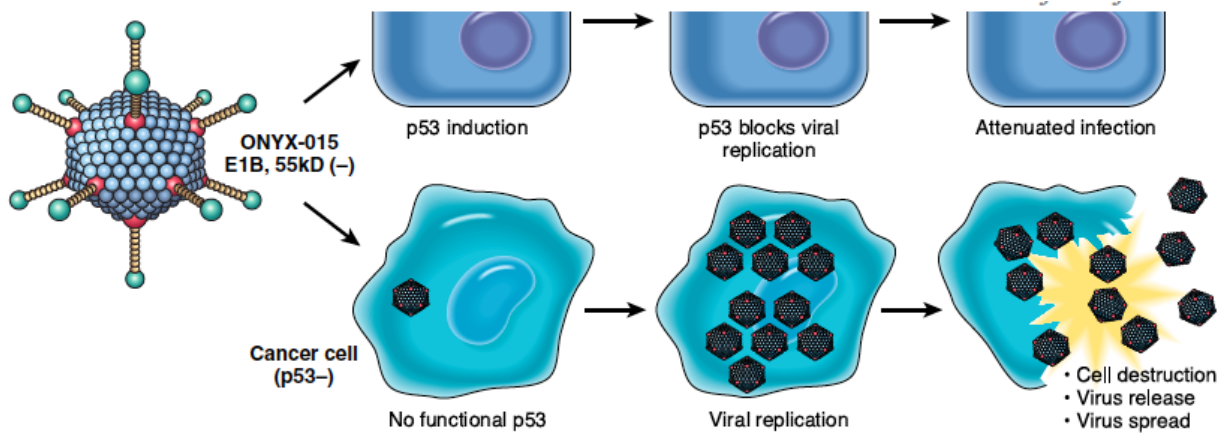
Existen virus que de forma natural ya poseen selectividad contra ciertos tumores, otros pueden ser modificados genéticamente para darles una selectividad. Los virus que poseen una selectividad tumoral inherente son el reovirus, parvovirus autónomo, virus de la enfermedad de Newcastle y virus de la estomatitis vesicular (Hallden et al., 2003). Los virus que se han modificado genéticamente incluyen adenovirus, herpesvirus, virus del sarampión, poliovirus, influenza virus y vaccinia virus. Para la investigación clínica se consideraron virus de baja patogenicidad y alta capacidad oncolítica, como el virus de la enfermedad de Newcastle, el virus de las paperas, el virus herpes simple, el virus Egipto 101, el virus de la influenza, el adenovirus serotipo 5 y el virus vaccinia.

Las modificaciones genéticas incluyen generalmente dos posibilidades. La primera consiste en eliminar genes del virus, como por ej. la delección del gen E1B del adenovirus (Figura 1). La otra opción es usar promotores específicos de tumor/tejido por ej. el promotor de la transcriptasa humana, el del factor de transcripción E2F1 o el del factor 1 $\alpha$  inducible por hipoxia (Jiang et al., 2006).

Las interacciones que ocurren entre el virus y la célula normal o cancerosa son complejas, e intervienen factores tanto externos como internos. Los externos como la adhesión del virus y entrada de las moléculas, y los internos como factores del hospedero y los productos génicos virales importantes para la replicación.

El tropismo de los virus oncolíticos está determinado por la interacción de la superficie de la partícula viral con receptores específicos de la superficie de células del hospedero. Aunque ya se conocen proteínas de unión al virus, la relación entre la distribución de receptores y el tropismo de los virus en humanos aún no se conoce. (Campbell and Gromeier, 2005).

El efecto terapéutico de los virus oncolíticos se cree que se basa en por lo menos los siguientes mecanismos: la oncólisis viral directa consecuente de la replicación viral intracelular; la oncólisis indirecta, por reacciones inmunológicas con infecciones no líticas de las células tumorales, y la inmunidad postoncolítica, que son reacciones inmunológicas del hospedero contra el material liberado a través de la citólisis viral (Campbell and Gromeier, 2005).



**Figura 1. Infección por un adenovirus oncolítico con delección del gen E1B55K.** El adenovirus posee la capacidad de replicarse y destruir células tumorales, lo que hará que libere más partículas virales que posteriormente infectarán a otras células tumorales, esto sin afectar a células normales (Nemunaitis, 1999).

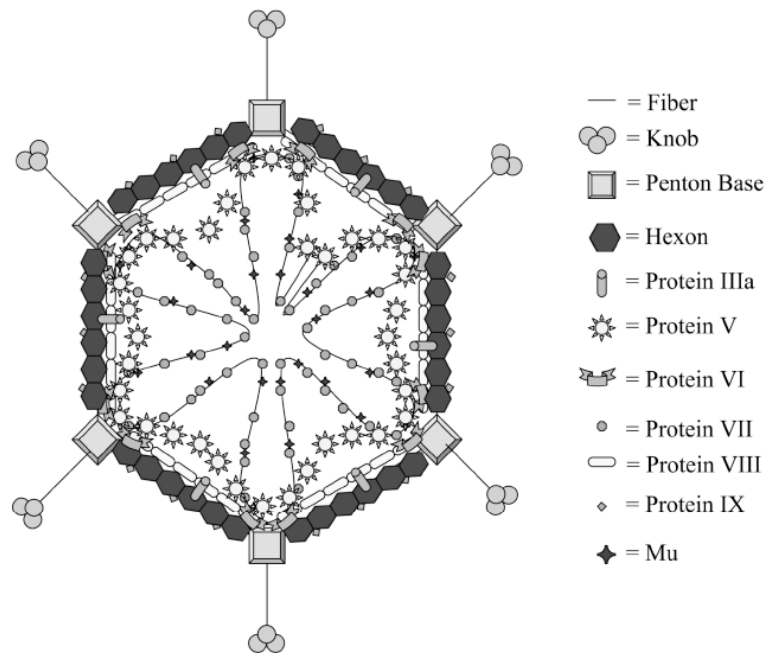
## 2.2. ADENOVIRUS

---

El adenovirus es un virus de ADN lineal de doble cadena, no envuelto, que no se integra al genoma, es lítico y su genoma abarca de 30-38 Kb codifica para 30-34 genes. Las infecciones generalmente ocurren en niños, puede infectar una gran variedad de células en división o reposo, de hígado, cerebro, pulmón corazón y músculo esquelético. En personas sanas (inmunocompetentes) causa leves problemas que se autolimitan; sin embargo, en personas inmunocomprometidas puede causar problemas más serios. La clasificación de los adenovirus esta basada en criterios inmunológicos como el serotipo. Actualmente existen más de 51 serotipos categorizados en 6 especies de la A a la F. Difieren en el uso de receptores y preferencia por un órgano en específico. Por ejemplo las especies D infectan ojos, especies A y F tracto

digestivo, especies del C, E y algunos del B el tracto respiratorio, mientras que otras especies del B infectan el tracto urinario (Jounaidi et al., 2007).

La unión inicial del adenovirus a la célula hospedera es mediada por el receptor coxsackie-adenovirus (CAR) el cual se une a la proteína fiber adenoviral, seguido por la internalización de las integrinas  $\alpha_v\beta_3$  y  $\alpha_v\beta_5$ , de la superficie celular las cuales se unen al motivo tripeptídico RGD (de Arginina-Glicina-Aspartato) de la base del pentón adenoviral (Wickham et al., 2000). Posteriormente entra a través de vesículas cubiertas de clatrina (Nemerow, 2002). La expresión de CAR aunque es común en líneas celulares establecidas (Hitt et al., 1997), puede variar enormemente en células tumorales (Miller et al., 1998).



**Figura 2. Estructura de un adenovirus.** La partícula viral es de forma icosaédrica y mide aprox. 80-100 nm de diámetro. Con el fin de empacar eficientemente el genoma viral completo es una estructura altamente organizada, conteniendo muchos componentes en el centro como en la pared (Jounaidi et al., 2007).



El adenovirus tiene características de eficacia, seguridad, y manipulación que le permiten ser considerado un fuerte candidato para ser utilizado como un virus oncolítico. Los genes que regulan la infección, replicación y/o patogénesis ya son conocidos. Son capaces de infectar células que están o no en división, sin integrarse al genoma. La forma salvaje produce enfermedades leves o muy limitadas en el humano. Pueden obtenerse grandes títulos y ser purificados con protocolos adecuados y guías de estudios clínicos.

Una vez que la célula es infectada el primer transcrito que se forma es el de E1A, el cual activa los demás genes tempranos. El gen E1B del Ad5 codifica para la proteína 19K y 55K (Rao et al., 1992). La desregulación del ciclo celular provocada por E1A induce la acumulación de p53, lo que puede resultar en apoptosis evitando la sobrevivencia de la célula y propagación del virus. La proteína 55K actúa bloqueando la apoptosis dependiente de p53 uniéndose directamente a ésta e inhibiendo su habilidad de inducir la expresión de genes proapoptóticos. La proteína 19K también inhibe la apoptosis desencadenada por la vía de los receptores de muerte de TNF $\alpha$  y TRAIL promovidas por E1A (McConnell and Imperiale, 2004).

El adenovirus ONIX-015 fue diseñado con la delección de E1B55K para tener selectividad contra células con alteración de p53, sin embargo estudios han mostrado que quizás p53 no es la base de su selectividad (O'Shea et al., 2004), ya que células con p53 han mostrado replicación del virus. Ensayos clínicos han mostrado que es seguro hasta  $2 \times 10^{12}$  partículas virales sin mostrar signos clínicos de hepatotoxicidad (McCormick, 2003). El estudio en líneas celulares tumorales que expresan altamente CAR podrían arrojar datos muy

optimistas y lo contrario en las células que expresan muy poco el receptor. Estudios que se realizaron con células de gliomas con el ONYX-015, donde las células de glioma tienen expresión baja o ausente del receptor mostraron poca susceptibilidad al adenovirus (Campbell and Gromeier, 2005).

El adenovirus ONYX-015 ha mostrado buenos resultados en combinación con quimioterapia y como monoterapia ha sido muy limitado (0-14% de regresión tumoral), quizá el hecho que el gen E1B esta involucrado en el transporte de RNAm viral y la disminución de síntesis de proteínas celulares (Babiss et al., 1985), podría explicar la pobre replicación y baja potencia en los tumores.

Más de 25 adenovirus oncolíticos han sido descritos como potenciales tratamientos contra el cáncer y 10 de ellos están en fases tardías de estudios preclínicos o ya siendo estudiados en humanos. El primer agente aprobado por la FDA de China para uso en pacientes fue el H101 (muy similar a ONYX-015) para tratar cáncer de cabeza y cuello en combinación con quimioterapia (Garber, 2006).

El adenovirus delta-24 o dl922-944, posee una mutación para el dominio conservado-2 de la proteína E1A y se une a Rb, lo que le da una selectividad a células tumorales con mutación o ausencia de Rb y ha mostrado una replicación en células tumorales hasta 100 veces mas eficiente que ONYX-015 (Fueyo et al., 2000). Debido a los problemas en expresión del receptor CAR por células tumorales se ha diseñado un adenovirus (delta-24-RGD) que infecta de forma independiente a CAR, uniéndose directamente a las integrinas, debido a que el motivo RGD se coloca en la proteína knob fiber. Delta-24-RGD mostró

ser superior en propagación viral y efecto oncolítico comparado a delta-24 tanto *in vitro* como *in vivo* (Fueyo et al., 2003).

Los ensayos clínicos realizados en pacientes no han mostrado claramente que la oncolisis directa sea el mecanismo que exclusivamente destruye a las células (Russell et al., 2012). Despertar una respuesta inmune podría aumentar los efectos benéficos terapéuticos de los virus oncolíticos. La respuesta inmune antitumoral es abolida por citocinas inhibitorias secretadas por el tumor y células inhibitorias del sistema inmune. El ambiente inmunosuprimido puede ser alterado por la infección del tumor con los adenovirus. La liberación de PAMPS y DAMPS después de la lisis de las células tumorales podría provocar la superación de la inmunosupresión del ambiente tumoral y estimular una inflamación localizada, que facilite el reconocimiento inmunológico de los antígenos asociados al tumor (Russell et al., 2012). Por ejemplo, múltiples inyecciones intratumorales del Ad delta-24-RGD produjeron una respuesta antitumoral y aumento de la sobrevivencia de animales con gliomas intracraneales en un modelo murino inmunocompetente (Jiang et al., 2014).

Un estudio (Kim et al., 2002) describió adenovirus oncolíticos con distintas delecciones del gen E1B con la capacidad de inducir apoptosis en líneas celulares tumorales humanas. Aunque ya es conocido el mecanismo de inducción de apoptosis por la proteína E1A, se reportó que la ausencia del gen E1B19K también da como resultado la inducción de apoptosis ya que al parecer este gen posee la capacidad de inhibirla (Rao et al., 2004). También se ha reportado recientemente que el gen E4orf4 induce apoptosis en forma

independiente a la presencia de p53 (Cabon et al., 2013). La apoptosis, aunque limita la replicación del adenovirus, podría favorecer el efecto terapéutico en forma aditiva, cuando la oncólisis no es posible.

La regresión completa del tumor depende importantemente de si el virus puede alcanzar las células tumorales, además, existen barreras físicas dentro del tumor (fibrosis, necrosis, heterogeneidad celular) y el desafío que representa la distribución sistémica en tumores que metastatizan (Russell et al., 2012).

### 2.3. LÍNEAS CELULARES MURINAS

---

Estudios previos sugieren que la infección y replicación de adenovirus humanos en células murinas es pobre. Se observó que los tejidos normales de ratón no son permisivos a la replicación de adenovirus humanos (Duncan et al., 1978). Se cree que existe un bloqueo dependiente de propiedades específicas de la especie de las células murinas, que dirigen una represión de la expresión de proteínas virales tempranas o defectos en algún punto de la replicación viral (Ganly et al., 2000). Entonces se asumió que replicación viral no podría ocurrir en tumores murinos lo que hace necesario usar células tumorales humanas que si son permisivas a la replicación del virus en ratones inmunosuprimidos (xenotrasplantes) para evaluar la eficiencia de la replicación del adenovirus. Sin embargo otros estudios han demostrado que si puede ocurrir *in vitro* e *in vivo*, la toma de adenovirus por células murinas, la expresión génica y replicación del ADN (Tomko et al., 1997).

Un estudio (Ganly et al., 2000) demostró que algunas células epiteliales de roedor pueden ser permisivas a la replicación de adenovirus (Ad2) produciendo una cantidad 25 a 50 veces menos partículas virales comparada a una línea celular humana (A2780cp). En este estudio se demostró que efectivamente las células murinas expresaron la proteína viral E1A, sin embargo esta no se correlacionó con la producción viral directamente. El hecho de que las líneas celulares tuvieron poca producción viral y una buena expresión de proteínas virales hace pensar que existe un bloqueo posterior a la producción del virus. Además señala que entre más diferenciadas se encontraban las células éstas eran más permisivas a la replicación del adenovirus.

Posteriormente un estudio (Hallden et al., 2003) en el que se utilizaron 9 células murinas tumorales de origen epitelial, demostró que la captura del adenovirus así como la expresión de proteínas virales eran muy similares entre la mayoría de las células murinas y células humanas analizadas.

Este año se ha reportado el desarrollo de un modelo murino inmunocompetente empleando células murinas de adenocarcinoma de pulmón (ADS-12) en un ratón 129 (Zhang et al., 2015). En este modelo se demostró la infección adenoviral, la producción de E1A, la producción viral y una respuesta al tratamiento con el adenovirus oncolítico AdTAV-255. Sin embargo este modelo no compara la producción de progenie viral entre las células murinas utilizadas y células humanas.

## 2.4. LÍNEA CELULAR TC-1

---

Las células TC-1 son células primarias epiteliales de pulmón de la cepa C57BL/6 inmortalizadas con los genes E6 y E7 del HPV-16 y transformadas con el oncogén activo ras (Lin et al., 1996). Esta transformación simula la forma de la patogénesis del cáncer cervical, por lo que esta línea es usada como modelo de cáncer cervical.

## 2.5. GENES E6 Y E7 DEL HPV16

---

El virus de papiloma humano posee las oncoproteínas E6 y E7, involucradas en la tumorigénesis del cáncer cervicouterino. Las proteínas E7 y E6 del HPV-16 participan en la desregulación del ciclo celular y la transformación celular uniéndose a pRb y p53, respectivamente (Steinwaerder et al., 2001). La unión E7-pRb libera el factor E2F, lo que induce a la célula entrar en la fase S y activa la vía de la apoptosis dependiente de p53. La proteína E6 se une a p53 e induce su degradación.

El gen E7 del HPV-16 tiene función similar al gen E1A del adenovirus serotipo 5 (Ad5). El gen E7 del HPV-16 codifica una proteína con una similitud en la secuencia de aminoácidos de los dominios conservados 1 y 2 de las proteínas de E1A (12S), lo que le confiere la capacidad de transactivar el promotor del gen E2 del Ad5, con una eficiencia comparable a la realizada por E1A del Ad5 (Phelps et al., 1988; Steinwaerder et al., 2001).

## 2.6. JUSTIFICACIÓN Y ORIGINALIDAD DEL ESTUDIO

---

Las células de ratón se han considerado no permisivas para la replicación de adenovirus humanos, lo que ha llevado al uso de células humanas que sí replican el virus en ratones inmunosuprimidos, para evitar que las células sean eliminadas por el sistema inmune y así estudiar la eficacia de los adenovirus. Este modelo no es adecuado ya que no permite evaluar la biodistribución, la toxicidad y la respuesta inmune desencadenada por adenovirus oncolíticos, por lo que es imprescindible desarrollar un modelo murino usando un ratón silvestre (inmunocompetente) que permita evaluar de una forma más completa los efectos de los adenovirus oncolíticos. Anteriormente ya se ha reportado que la expresión de los genes E6 y E7 del HPV-16 en células humanas facilitan la replicación del adenovirus. Las células tumorales murinas TC-1 poseen los genes E6 y E7 del HPV-16, por lo tanto los adenovirus podrían replicarse en ellas y producir partículas infectivas; es decir, la línea TC-1 podría ser usada como modelo tumoral en ratones inmunocompetentes para probar los adenovirus oncolíticos.



## **2.6. HIPÓTESIS**

---

Los adenovirus oncolíticos se replican en la línea celular murina TC-1.

## **2.7. OBJETIVO GENERAL**

---

Determinar si el adenovirus oncolítico Adhz60 se replica e induce oncólisis en la línea celular murina TC-1 que expresa los genes E6 y E7 del VPH-16.

## **2.8. OBJETIVOS PARTICULARES**

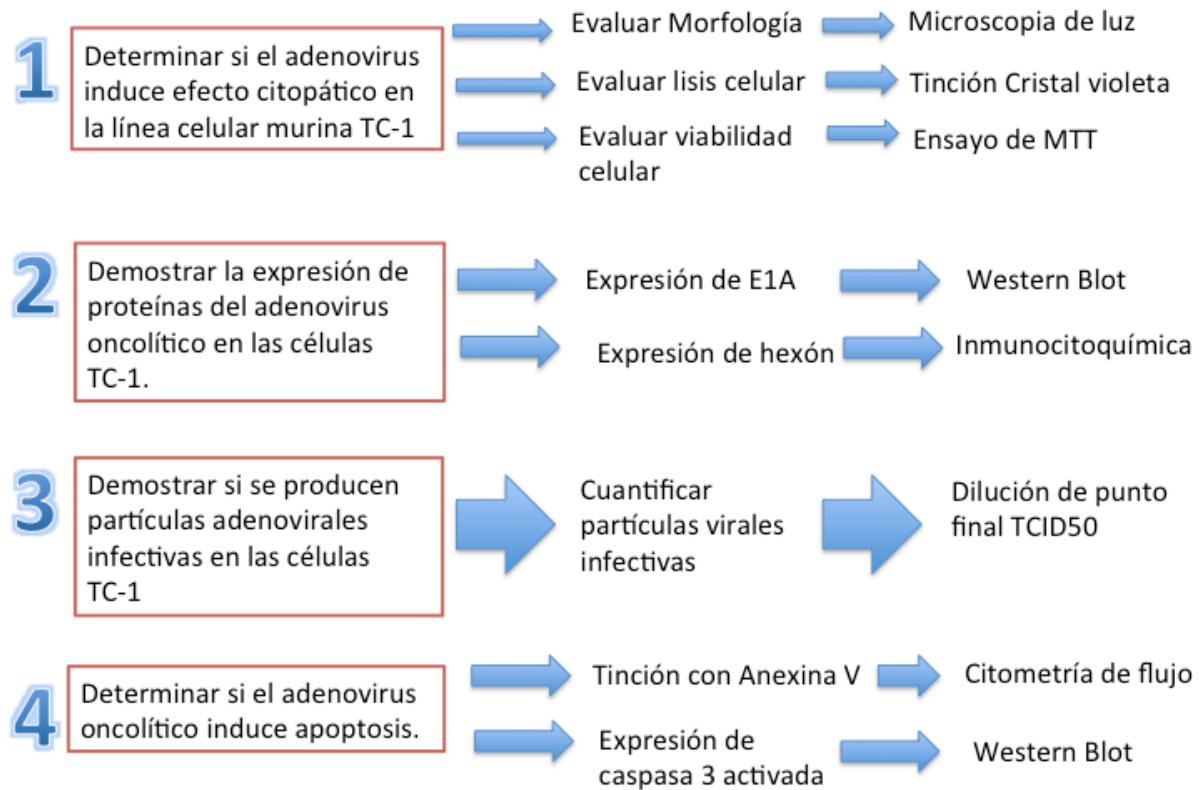
---

1. Determinar si el adenovirus oncolítico Adhz60 induce efecto citopático en la línea celular murina TC-1.
2. Demostrar la expresión de proteínas del adenovirus oncolítico Adhz60 en las células TC-1.
3. Demostrar si se producen partículas adenovirales infectivas en las células TC-1.
4. Determinar si el adenovirus oncolítico Adhz60 induce apoptosis.

## Capítulo 3. MATERIALES Y MÉTODOS

---

### 3.1. Plan de Trabajo



## 3.2. Material

### 3.2.1. Material Biológico

- Líneas celulares
  - HEK293 (ATTC # CRL-1573) DMEM, FBS 10% y PS 100 U/mL.
  - LLC-1 Lewis Lung Carcinoma, (LLC-1) (ATCC # CRL-1642) DMEM, FBS 10% y PS 100 U/mL.
  - TC-1 (ATTC # CCL-2), RPMI-1640, FBS 10% y PS 100 U/mL.
  - HeLa (ATTC # CCL-2), RPMI-1640, FBS 10% y PS 100 U/mL.
  
- Anticuerpos
  - Anti Caspasa 3 humana activada de conejo (Asp175) (Cell Signaling).
  - Anti Adenovirus E1A (BD Pharmingen).
  - Anti Adenovirus hexón (Clontech Laboratories, Inc).
  
- Adenovirus. Proporcionados por el Dr. Heshan Sam Zhou del James Graham Brown Cancer Center de la Universidad de Louisville, KY, E.U.A.
  - Adwt
  - Adhz60
  - Adhz63
  - Ad5CMV-LacZ (AdLacZ)

- Reactivos
  - Marcador de peso molecular
  - PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen))
  - Adeno-X Rapid Titer Kit (Clontech Laboratories, Inc)
  - BCA Protein Assay Kit (Pierce)
  - Cristal Violeta
  - PBS (Sigma)
  
- Medios de Cultivo ( Sigma-Aldrich)
  - Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM)
  - Medio esencial mínimo (MEM)
  - Roswell Park Memorial Institute (RPMI)

### 3.2.2. Equipo

- Micropipetas de volúmenes de 0.5 µL a 10 µL, 20 µL, a 200 µL, 200 µL a 1000 µL
- Cámara de Electroforesis (Bio-rad)
- Cámara de Transferencia (Bio-rad)
- Máquina de Revelado de films
- Films para revelar (Kodak)
- Incubadora de CO<sub>2</sub>
- Campana de seguridad Nivel II
- Microscopio invertido (Olympus Microsystems)

- Microcentrífuga
- Refrigerador (4 °C)
- Congelador (-20 °C)
- Ultracongelador (-80 C°)
- Autoclave
- Espectrofotómetro (Biotek)
- Escáner Scanjet 4070 (HP)
- Citómetro de flujo (Becton Dickinson)
- Software FlowJo para análisis de citometría de flujo (Tree Star)

### **3.3. Métodos**

#### **3.3.1. Evaluación de morfología celular**

Se sembraron  $5 \times 10^5$  células /pozo en una caja de 6 pozos las líneas HeLa, TC-1, LLC-1. Se incubaron con CO<sub>2</sub> 5% a 37 °C por 24 h. Se infectaron con el Adhz60 con un MOI de 10 y se evaluaron los cambios en la morfología a las 0, 24, 48 y 72 h.

#### **3.3.2. Tinción con cristal violeta**

Se sembraron  $5 \times 10^4$  células/pozo en cajas de 24 pozos las líneas HeLa, TC-1 y LLC-1. Se infectaron con el Adhz60 con un MOI de 1, 2.5, 5 y 10. Además un pozo sin infectar. Se incubaron con CO<sub>2</sub> 5% a 37° C. Después de 72 h se retiró el medio y células flotantes, las células adheridas se fijaron con 300 µL de formaldehído al 3.7% por 3 min a temperatura ambiente. Se eliminó

el fijador usando vacío y se incubó con 300  $\mu$ L de cristal violeta al 1%. Se retiró el cristal violeta con vacío, y se agregó 500  $\mu$ L de PBS ( $Mg^{+}$  y  $Ca^{+}$ ), se retiró y se dejó secar.

### **3.3.3. Ensayo de viabilidad celular con MTT**

Se sembraron  $5 \times 10^4$  células/pozo en cajas de 12 pozos las líneas HeLa, TC-1 y LLC-1. Se incubaron con  $CO_2$  5% por 24 h. Se infectaron con el Adhz60 con MOI de 1, 2.5, 5 y 10, además de un pozo sin infectar. Se incubaron con  $CO_2$  5% a 37 °C por 72 h. Se repitió el mismo procedimiento para células sin infectar. Se agregó 100  $\mu$ L de MTT en cada pozo a 37° C y se incubó por 4hrs. Se agregó 50  $\mu$ l de Buffer de lisis (10% SDS in 0.01N HCl) y se dejó a 37°C toda la noche. Se leyó a 570 nm en el espectrofotómetro como porcentaje de células vivas.

### **3.3.4. Detección de proteínas E1A y caspasa 3 activada**

Para detectar la proteína E1A se sembraron  $5 \times 10^5$  células/pozo en cajas de 6 pozos las líneas HeLa, TC-1 y LLC-1. Se incubaron con  $CO_2$  5% por 24 h. Se infectaron con el Adhz60 a un MOI de 10. Se incubaron con  $CO_2$  5% a 37 °C y se realizaron extractos de proteínas a las 0, 24, 48 y 72 h utilizando Buffer RIPA. Se cuantificaron las proteínas con el kit BCA Protein Assay (Pierce), para cargar 40  $\mu$ g de proteínas por carril en un SDS-PAGE al 12%.

### **3.3.5. Inmunocitoquímica para hexón**

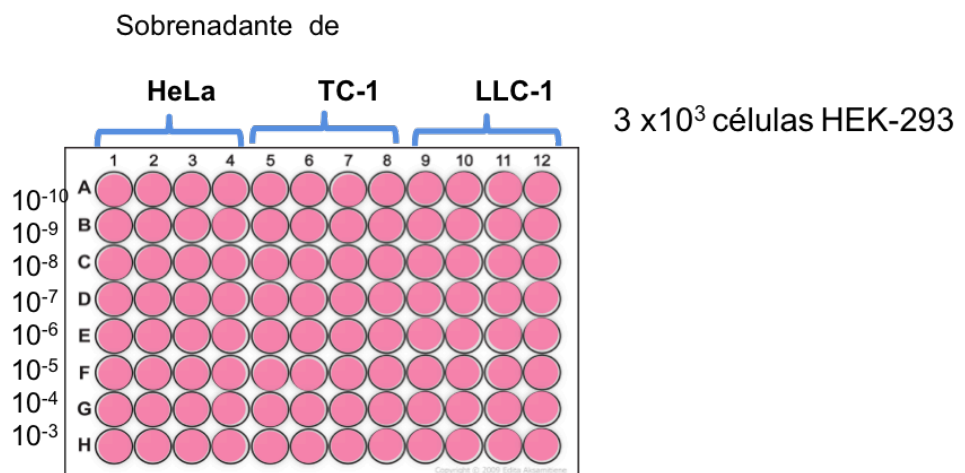
Se siguieron las instrucciones del manual del kit AdenoX Rapid Titer Kit, (Clontech, Mountain View, CA). Fueron sembradas  $5 \times 10^4$  células de las líneas celulares HeLa, TC-1 y LLC-1 en una caja de 24 pozos, al siguiente día fueron infectadas con el Adhz60 y AdLacZ con un MOI de 10, se incubaron a 37 °C con CO<sub>2</sub> 5% por 48 h. Cada pozo con células fue fijado con 0.5 mL de metanol 100% frío por 10 min a -20 °C. Se retiró el metanol y se lavó 3 veces con 0.5 mL de buffer de lavado (PBS con BSA al 1%). Se agregó 0.25 mL a cada pozo del anticuerpo anti-hexón 1:1000 en Buffer de lavado. Se incubó 1h a 37 °C. Se aspiró el anticuerpo y se lavó 3 veces con 0.5 mL de buffer de lavado. Se agregó 0.25 mL a cada pozo del anticuerpo anti-ratón de conejo conjugado a HRP diluido 1:500 en buffer de lavado. Se incubó 1 h a 37 °C. Se aspiró el anticuerpo secundario y se lavó 3 veces con 0.5 mL de buffer de lavado. Se agregó 0.25 mL de DAB y se incubó 10 min a temperatura ambiente. Se aspiró el DAB y se agregó 0.5 mL de PBS en cada pozo.

### **3.3.6. Cuantificación de partículas adenovirales**

Se sembraron  $5 \times 10^5$  células /pozo en una caja de 6 pozos las líneas HeLa, TC-1 y LLC-1. Se incubaron con CO<sub>2</sub> 5% a 37 °C por 24 h. Se infectaron con el Adhz60 con un MOI de 10 y se dejaron incubando 72 h. Se recolectó el sobrenadante de cada línea celular. Se centrifugaron a 1000 g 5 min y se pasaron a nuevos tubos. Se realizaron 10 diluciones seriadas de cada sobrenadante. Se realizó el método de dilución de punto final TCID<sub>50</sub>. Como se



muestra en la Figura 3. En una caja de 96 pozos se sembraron  $3 \times 10^3$  células HEK293 por pozo, las cuales al siguiente día se infectaron con las diferentes diluciones incubándose durante 7 días (Sandig et al., 2000). Para las diluciones se tomó 100  $\mu$ L del primer del tubo 1 que posee el sobrenadante no diluido y agregándolo al tubo 2 con 900  $\mu$ L de medio, se mezcla bien y del tubo 2 se tomaron 100  $\mu$ L para el tubo 3 y así sucesivamente, lo que hace diluciones de 10 veces cada vez. Así el tubo 2 representa la dilución  $10^2$ , el tubo 3 la  $10^3$  y así hasta la dilución  $10^{10}$ . Se cambiaron las puntillas en cada dilución. Para cada dilución se utilizaron 4 pozos. Cada uno de estos 4 pozos tiene un valor de 2.5 si se observa efecto citopático en las células HEK293 y el valor se eleva a la potencia de la dilución pero en valor positivo. Ejemplo si fueron 3 pocillos en la dilución  $10^{-7}$  la concentración es  $7.5 \times 10^{-7}$  ifu/mL, y se tomó la dilución más diluida donde se observó CPE, es decir sí se ve solo 1 pocillo con CPE en  $10^{-9}$  la concentración será  $2.5 \times 10^{-9}$  ifu/mL.



**Figura 3. Método de dilución de punto final TCID<sub>50</sub>.** Se siembran células HEK293 que se infectan con las diferentes diluciones del medio infeccioso obtenido de las otras líneas celulares.

### **3.3.7. Detección de apoptosis mediante citometría de flujo.**

Para la detección de apoptosis mediante citometría de flujo se siguieron las indicaciones del kit PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences, USA). Se sembraron en platos de 60 mm  $1 \times 10^6$  células de las líneas celulares HeLA, TC-1 y LLC-1. Al siguiente día se infectaron con Adhz60, AdLacZ y un plato sin infectar. Los platos se incubaron por 72 h a 37 °C con CO<sub>2</sub> 5%. Se les dio 2 lavados con PBS y se resuspendió en 1 mL de Binding Buffer 1X. De cada uno se tomaron 100 µl y se pasaron a un tubo de 5 mL. A este tubo se agregó 5 µL de Anexina V unido a PE o 5 µL 7-AAD o ambos para la compensación. Se mezclaron bien, se incubaron 15 min a temperatura ambiente en la oscuridad. Después se agregaron 400 µL de Binding buffer 1x a cada tubo y después de 1 h se realizó el análisis.

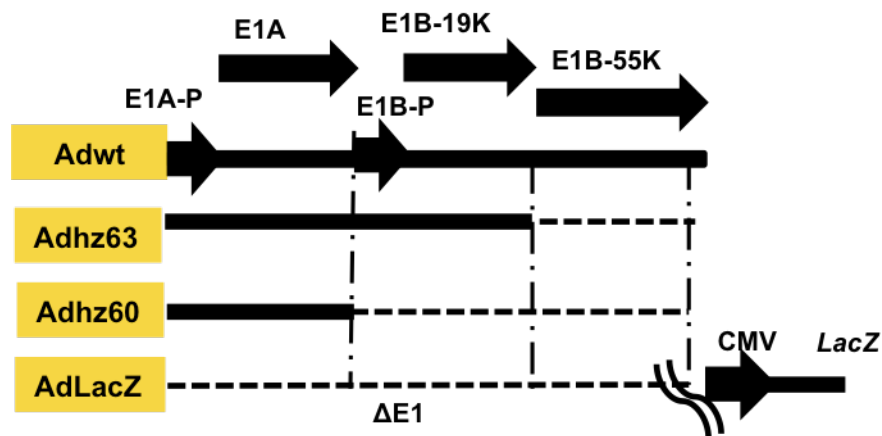
### **3.3.8. Análisis estadístico**

Los resultados de los ensayos fueron analizados por la prueba T student, no pareada. Un nivel de significancia de  $P < 0.05$  fue considerado estadísticamente significativo.

## Capítulo 4. RESULTADOS

### 4.1. Adenovirus utilizados en el estudio.

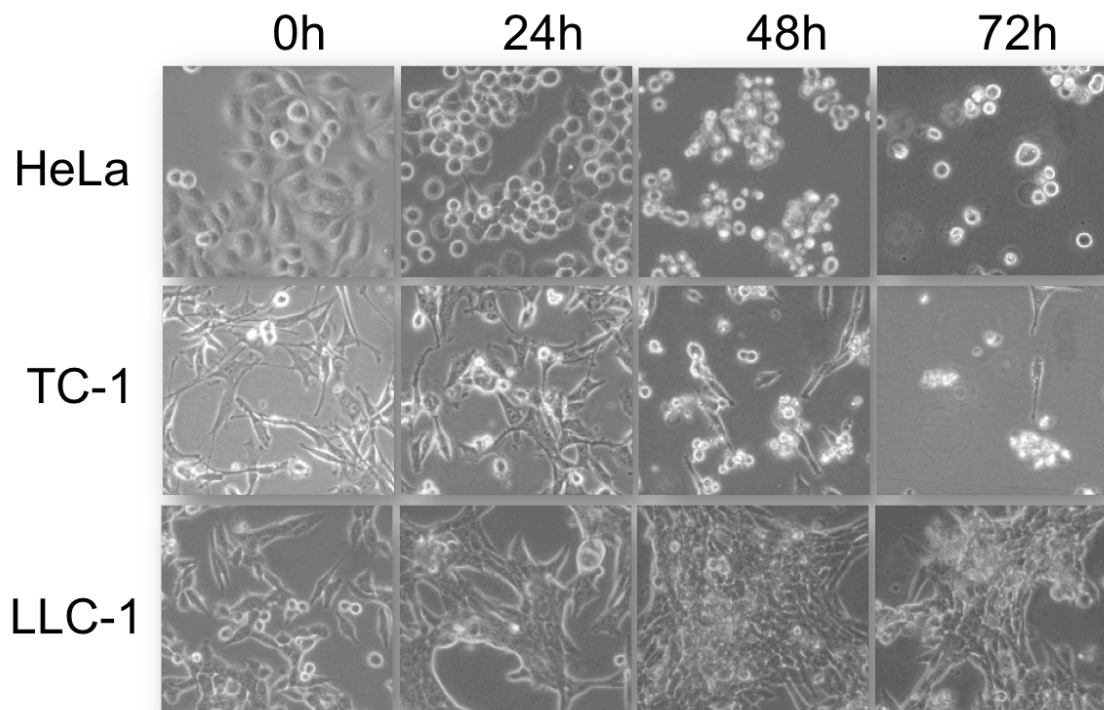
El adenovirus Wild Type cuenta con todos los genes intactos. El Adhz63 cuenta con una delección parcial del gen E1B (correspondiente a la proteína 55K). El Adhz60 carece completamente del gen E1B (proteínas 19K y 55K). El AdLacZ carece del gen E1A y E1B lo que hace que no se replique; además expresa la proteína beta-galactosidasa bajo el promotor CMV.



**Figura 4. Elementos que componen los adenovirus utilizados.** P, promotor. CMV, promotor de citomegalovirus. Wt, forma silvestre (Wild Type). LacZ, gen de beta-galactosidasa. ΔE1, delección de gen E1A. Las líneas punteadas representan regiones eliminadas.

#### 4.2. La línea celular TC-1 muestra efecto citopático

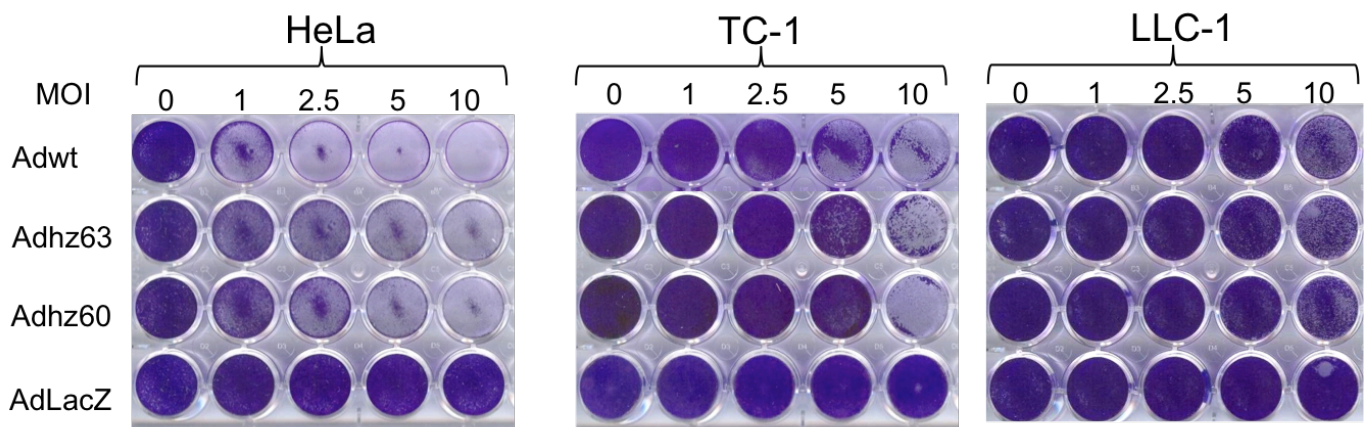
El Adhz60 indujo a las 72 h CPE evidente en las células TC-1 (que poseen los genes E6 y E7 del HPV-16) y las células HeLa, en el cual las células pierden la adherencia a la superficie, adquieren una forma más redonda llegando a fusionarse con otras células. Las células LLC-1 presentan un CPE muy disminuido. Además la cantidad de células a lo largo del tiempo se observan disminuidas en las líneas celulares HeLa y TC-1 mientras que en la línea celular LLC-1 no se observó disminución importante.



**Figura 5. Morfología celular en las 3 líneas celulares infectadas con Adhz60.**  $5 \times 10^5$  células de las 3 líneas celulares fueron sembradas e infectadas con 10 MOI al día siguiente, se incubaron y observó la morfología a las 0, 24, 48 y 72 h. Las células TC-1 y HeLa reflejaron CPE muy evidente mientras que LLC-1 presenta un CPE muy disminuido. Fotografías tomadas a un aumento de 20X en diferentes tiempos.

### 4.3. Las células TC-1 sufre lisis celular

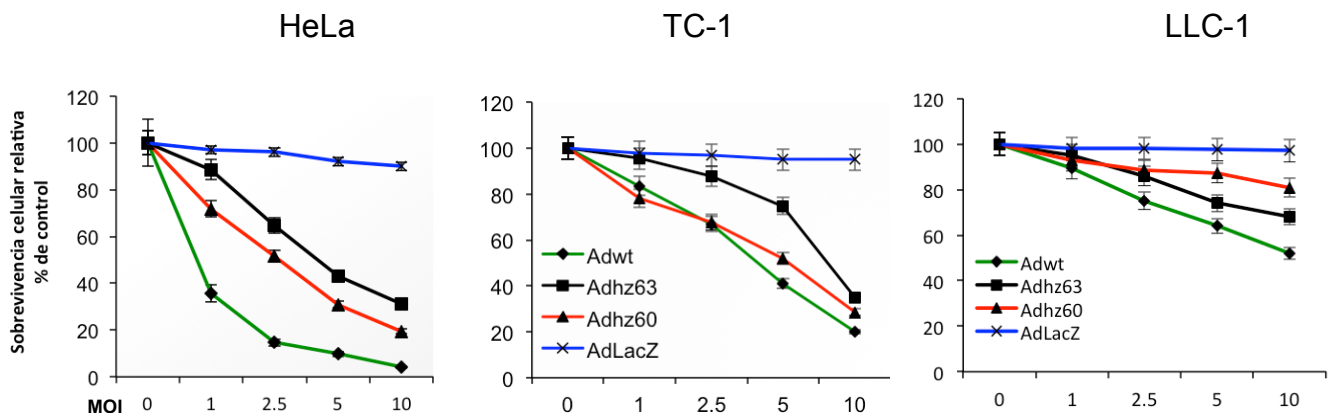
La línea celular HeLa fue la mayormente lisada por Adhz60, Adhz63 y Adwt sin efecto con el AdLacZ. En la Línea LLC-1 se observó muy poca lisis en general incluso a MOI de 10 para todos los adenovirus. La línea TC-1 sí mostró un grado de lisis importante a un MOI de 10 para los adenovirus Adhz60, Adhz63 y Adwt



**Figura 6. Efecto de lisis producido en células TC-1 por los distintos adenovirus.** Tinción con cristal violeta usando diferentes MOI de los adenovirus.  $5 \times 10^4$  células de las 3 líneas celulares fueron sembradas e infectadas al día siguiente con 0, 1, 2.5, 5 y 10 MOI del Adwt, Adhz60, Adhz63 y AdLacZ. A los 3 días de incubación se fijaron y tiñeron con cristal violeta. HeLa presentó un efecto de lisis a bajas concentraciones con los Adenovirus Adwt, Adhz60, Adhz63. Las células LLC-1 no presentan lisis significativa con ninguno de los virus usados a esas concentraciones. TC-1 muestra lisis importante solamente a 10 MOI de Adwt, Adhz60, Adhz63. El AdLacZ no mostró efecto de lisis en ninguna línea como se esperaba. Un experimento representativo de tres es mostrado.

#### 4.4. El adenovirus Adhz60 disminuye la viabilidad de las células TC-1

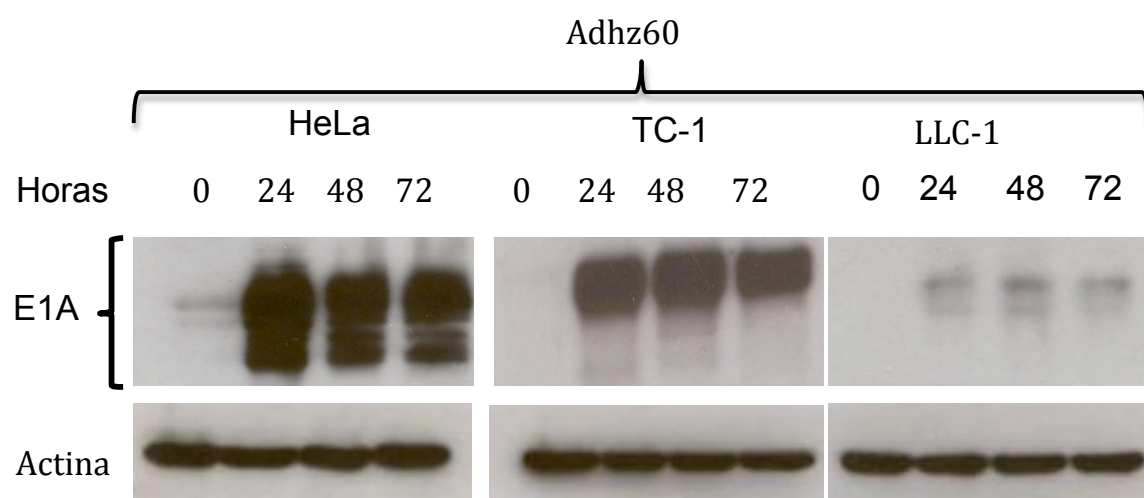
Los efectos observados a 10 MOI fueron los siguientes: El adenovirus Adwt disminuyó significativamente la sobrevivencia en células HeLa (4.25%), las células TC-1 fueron afectadas de forma importante (20%) mientras que las LLC-1 no disminuyeron en forma significativa su sobrevivencia (52%) El Adhz60 disminuyó la viabilidad de las células TC-1 a 28.56%, en las células HeLa 19.34% y las LLC-1 a 80%. El adenovirus Adhz63 disminuyó la viabilidad de las células TC-1 a 35%, en las células HeLa 31% y las LLC-1 a 68%. El AdLacZ no afectó la sobrevivencia en ninguna de las líneas celulares.



**Figura 7. Viabilidad celular de las células TC-1 ante el Adhz60.** Ensayo de viabilidad con MTT en células infectadas con los distintos adenovirus. Adwt, Adhz60 y Adhz63 afectaron de forma importante la sobrevivencia en la línea HeLa y la línea TC-1; en la línea LLC-1 los adenovirus no afectaron de forma significativa la sobrevivencia. El AdLacZ no afectó la sobrevivencia en ninguna de las 3 líneas celulares. Se realizaron 3 experimentos independientes.  $\pm$  Barras de error, desviación estándar.

#### 4.5. La línea celular TC-1 produce la proteína temprana E1A

La proteína de E1A fue expresada altamente en la línea celular HeLa, Las células LLC-1 expresó escasamente la proteína E1A, mientras que la línea TC-1 presentó buena expresión de la proteína. Como control de carga se usó la proteína alfa actina.

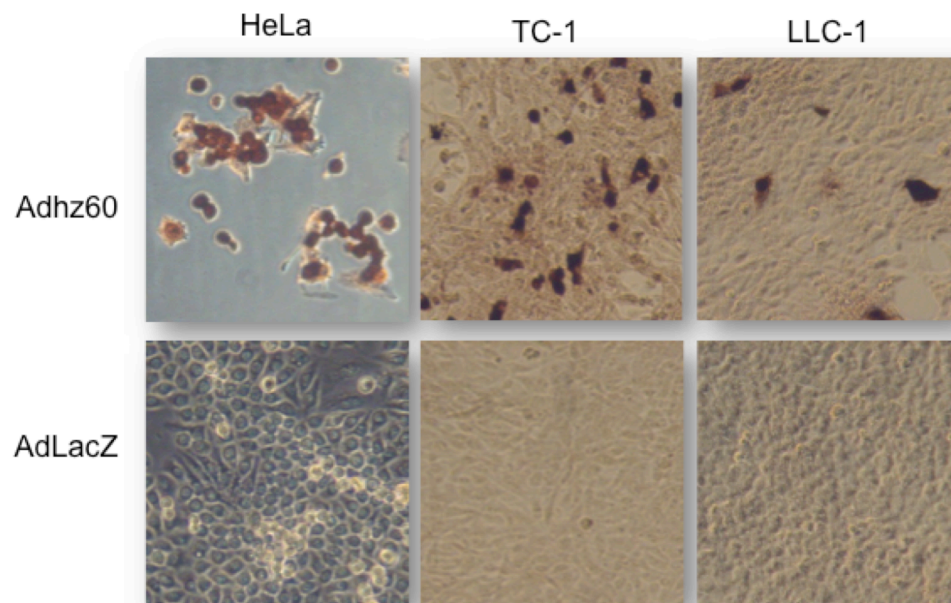


**Figura 8. Expresión de la proteína temprana adenoviral E1A en la línea TC-1.**  $5 \times 10^5$  células de las 3 líneas celulares fueron sembradas e infectadas al día siguiente con 10 MOI del Adhz60. A las 0, 24, 48 y 72 h se realizaron extractos de proteínas de las células para realizar un western blot para la proteína E1A. Las líneas celulares HeLa y TC-1 expresaron altamente la proteína E1A; mientras que la línea LCC-1 expresó en forma escasa la proteína E1A. Se muestra la expresión de  $\alpha$ -actina como control de carga.



#### 4.6. Las células TC-1 producen la proteína tardía hexón

La línea celular HeLa infectada con Adhz60 mostró positividad para todas las células, la línea LCC-1 mostró muy poca positividad mientras que en la línea TC-1 se observó mayor positividad que en la línea LLC-1. Las 3 líneas infectadas con el AdLacZ no mostraron positividad para la proteína.

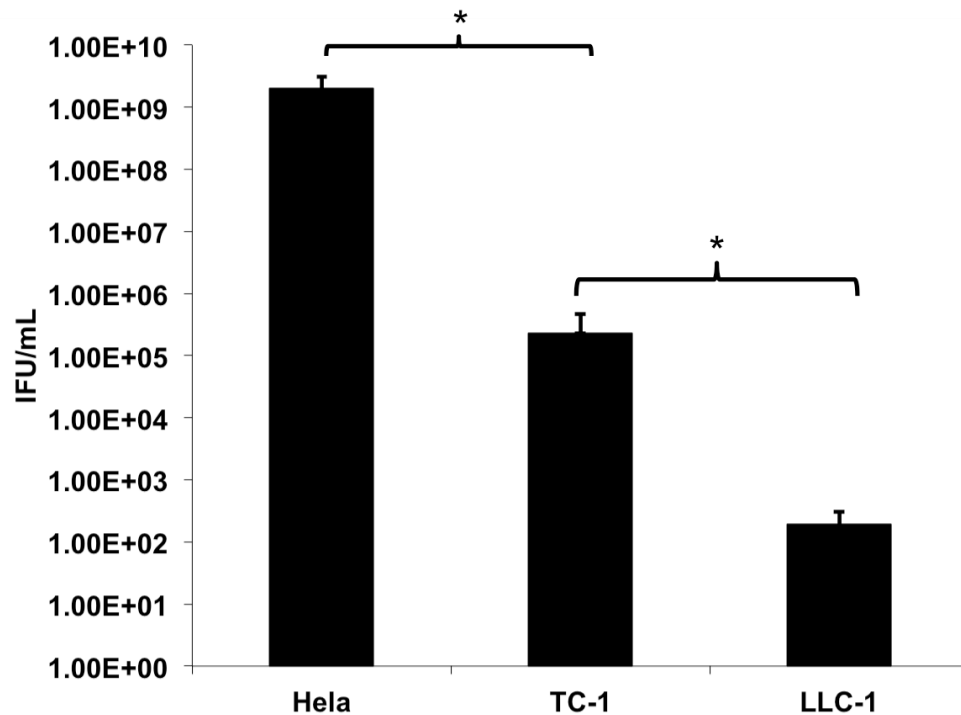


**Figura 9. Expresión de la proteína tardía adenoviral hexón en la línea TC-1 infectada con el Adhz60.** Inmunocitoquímica para hexón a las 48 h de infección con 10 MOI del Adhz60 mostró máxima positividad para la línea Hela; la línea TC-1 presentó mayor positividad comparada a LLC-1 la cual tuvo positividad muy baja. Células infectadas por el control AdLacZ en las mismas condiciones que Adhz60, no presentó señal para E1A de acuerdo a como se esperaba. Se muestra un experimento representativo de tres realizados.



#### 4.7. La línea celular TC-1 produce partículas virales infectivas

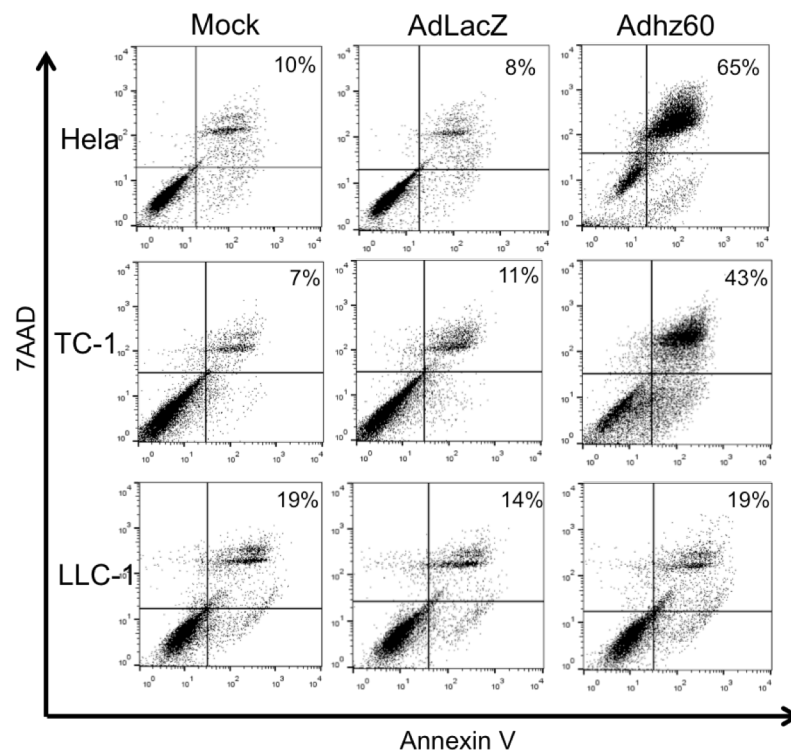
La línea celular HeLa produjo  $1 \times 10^9$  ifu/mL, TC-1  $1 \times 10^5$  ifu/mL y la línea LLC-1  $1 \times 10^2$  ifu/mL.



**Figura 10. Titulación de la producción de partículas adenovirales infectivas en células TC-1.** Se sembraron  $5 \times 10^5$  células de las líneas celulares HeLa, TC-1 y LCC-1, al día siguiente se infectaron con 10 MOI de Adhz60, se incubaron 72 h para recolectar el sobrenadante y realizar diluciones seriadas que se usaron para infectar células HEK293 durante 7 días de incubación y observar a que dilución se observaría el CPE (Método de dilución de punto final). La línea celular HeLa produjo  $1 \times 10^9$  ifu/mL, TC-1  $1 \times 10^5$  ifu/mL y la línea LLC-1  $1 \times 10^2$  ifu/mL. Representación de 3 experimentos independientes.  $\pm$  Barras de error, desviación estándar. (\* $p < 0.05$ ).

#### 4.8. Las células TC-1 sufren apoptosis tardía

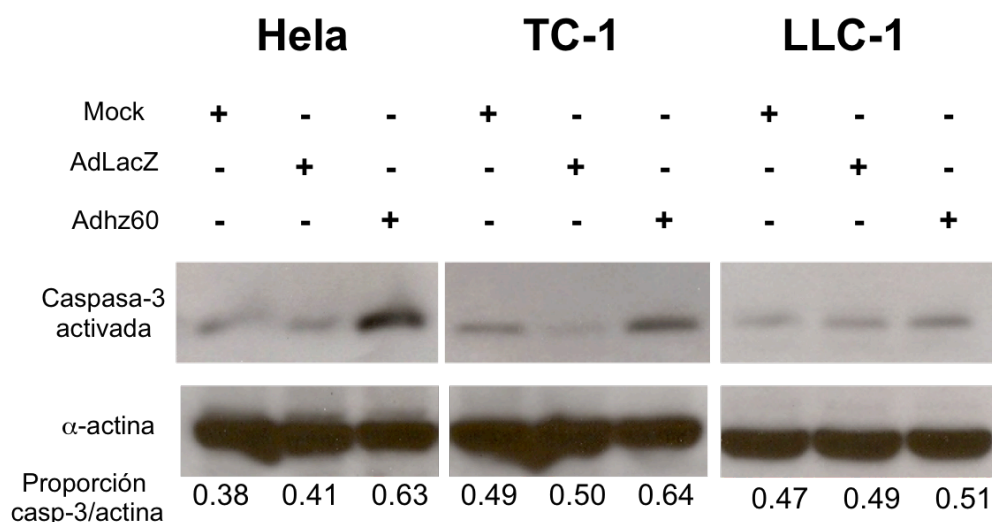
Las 3 líneas celulares se infectaron con los adenovirus Adhz60, AdLacZ y sin infectar, durante 72 h. Las células HeLa, TC-1 y LLC-1 presentaron 65%, 43%, y 19% de apoptosis, respectivamente. Los controles negativos AdlacZ y Mock presentaron resultados muy similares en las respectivas líneas celulares.



**Figura 11. Cuantificación de apoptosis tardía en células TC-1 infectadas con Adhz60.** Se sembraron  $1 \times 10^6$  células de las líneas celulares HeLa, TC-1 y LCC-1, al día siguiente se infectaron con 10 MOI de Adhz60 y se incubaron durante 72 h, para teñir con 7AAD y anexina V unido a ficoeritrina para cuantificar posteriormente por citometría de flujo. Se usaron además células sin infectar (Mock) y AdLacZ como control. Se observó que la línea TC-1 infectada con adhz60 presentó mayor porcentaje de apoptosis comparado a la línea LC-1. La línea HeLa fue la que presentó mayor apoptosis. El análisis se realizó con el software FlowJo.

#### 4.9. El Adhz60 activa la vía de apoptosis en las células TC-1

La señal expresada para caspasa 3 activada para HeLa fue alta, la línea TC-1 también expresó de forma importante la proteína mientras que su expresión de en la línea LCC-1 fue baja. Los controles negativos Mock y el AdLacZ produjeron una expresión similar y escasa en las 3 líneas celulares. Se muestra en la figura 12 la proporción relativa respecto a alfa actina por densitometría para cada caso.



**Figura 12. Expresión de caspasa 3 activada en las células TC-1 infectadas con Adhz60.**  $5 \times 10^5$  células de las 3 líneas celulares fueron sembradas e infectadas al día siguiente con 10 MOI del Adhz60, AdLacZ y sin infectar. A 72 h se realizaron extractos de proteínas de las células para realizar un western blot para la proteína caspasa-3 activada. Las líneas celulares HeLa y TC-1 expresaron en mayor grado la proteína caspasa-3 activada comparada a los controles; mientras que la línea LCC-1 expresó la proteína muy similar a los controles. Se muestra la expresión de  $\alpha$ -actina como control de carga y la relación por densitometría de caspasa-3 con actina.

## Capítulo 5. DISCUSIÓN

---

La terapia con virus oncolíticos ha mostrado resultados prometedores en modelos animales y en humanos al combinarse con quimioterapia (Norman et al., 2001). Actualmente se encuentra una intensa investigación sobre virus que posean aún más selectividad por células tumorales, mayor capacidad de destrucción y mejores resultados terapéuticos.

El adenovirus serotipo 5 mostró desde 1950 efectos de oncólisis en células de cáncer de cérvix humano, por lo que los investigadores lo han estudiado ya que es fácil de manipular.

En este trabajo empleamos un adenovirus (Adhz60) serotipo 5 que presenta la delección del gen E1B, lo que implica que la proteína E1B-55K, cuya función es bloquear a p53, no sea sintetizada. p53 impide la propagación viral llevando la célula a apoptosis o deteniendo el ciclo celular. Hasta 50% de las células tumorales, tienen ausencia o alteración de p53 (Levine et al., 1991), por lo que la célula no es detenida en el ciclo celular y/o llevada a apoptosis y la replicación viral si puede continuar. La delección de E1B-55K le da una selectividad para replicarse en células con alteración de p53, sin embargo, algunos estudios han mostrado que el virus se replica en células que conservan p53 (O'Shea et al., 2004); por lo que quizás, p53 no es la base de su selectividad.

Los virus oncolíticos podrían replicarse e inducir una potente respuesta inmune que aumente el efecto terapéutico, pero que limite la distribución del

virus en las células tumorales ya que el sistema inmune es considerado una barrera para la administración repetitiva de estos agentes.

Para probar la actividad terapéutica potencial de los virus oncolíticos, un modelo animal debe ser inmunocompetente y soportar una producción viral activa. La habilidad para estudiar el impacto de la replicación viral dentro de las células tumorales en el sistema inmune está limitado por la falta de un modelo murino adecuado, particularmente para adenovirus, los cuales se han reportado que, aunque pueden infectar células de ratón, no liberan nuevas partículas virales.

Los modelos animales con los que se cuentan para evaluar los adenovirus implican el uso de ratones inmunosuprimidos con xenotrasplantes, es decir, que se trasplantan células tumorales humanas. Esto se debe a que hace décadas se demostró que los tejidos normales de ratón no son permisivos a la replicación de adenovirus humanos (Duncan et al., 1978). Entonces se asumió que replicación viral no podría ocurrir en tumores murinos y que los xenotrasplantes de tumores humanos eran necesarios para evaluar la eficiencia de la replicación. Sin embargo, si se desean evaluar adenovirus para su uso en pacientes este modelo inmunosuprimido no presenta relevancia clínica, ya que no cuenta con un sistema inmune funcional y no refleja la respuesta inmune del hospedero contra el virus o el efecto del virus en la inducción de una respuesta inmune antitumoral y no es posible evaluar los efectos de biodistribución del virus, la respuesta inmune y los efectos colaterales asociados a la replicación del virus (Thomas et al., 2006).

Otros estudios han demostrado *in vitro* e *in vivo*, que el adenovirus puede ser tomado por células murinas y ocurrir expresión génica y replicación del DNA (Tomko et al., 1997). Otro grupo de trabajo (Ganly et al., 2000) demostró *in vitro* que el CPE podía ser inducido en algunas células tumorales murinas de origen epitelial y que al ser infectadas había expresión de genes virales y producción de unidades formadoras de placa.

Posteriormente, en un estudio (Hallden et al., 2003) donde se utilizaron 9 diferentes líneas celulares murinas tumorales de origen epitelial, se demostró la infección con el virus oncolítico, así como la expresión de sus proteínas, eran muy similares entre la mayoría de las células murinas y células humanas analizadas. Al analizar un modelo *in vivo* la línea que derivaba de cáncer de pulmón (CMT-64) fue la que mostró ser más permisiva a la replicación viral. Este autor señala que la mayoría del bloqueo en la producción viral ocurre al parecer en una fase tardía el ciclo de replicación. Además se observó que las células más diferenciadas eran las que fueron más permisivas a la replicación viral. Al comparar células murinas (CMT-93) poco permisivas (comparadas con células humanas) en un ratón desnudo se observó que el efecto terapéutico por el adenovirus oncolítico (wild-type) era mejor en el ratón inmunocompetente, por lo cual la participación del sistema inmune tiene un rol importante en el resultado del tratamiento, por lo menos así fue demostrado con las células que se usaron en este estudio. También evidenció que el hecho de que las CMT-93 sean poco permisivas no se traduce necesariamente en un bajo efecto terapéutico, ya que 70% de los ratones (inmunocompetentes) presentaron

regresión completa al tumor desarrollado, sin embargo el efecto terapéutico fue mayor usando las células CMT-93 que mostraban mayor replicación viral y la regresión fue del 100%.

En este trabajo por primera vez hemos empleado la línea celular murina TC-1, proveniente de epitelio pulmonar (Lin et al., 1996), de ratones C57BL/6 con el fin de establecer un modelo inmunocompetente en el cual sea posible evaluar el tratamiento con adenovirus en una fase preclínica. La línea celular TC-1 posee los genes E6 y E7 del HPV-16, lo cual ya se ha reportado que ayuda a la replicación del adenovirus (Phelps et al., 1988, Steinwaerder et al., 2001). Por lo anterior, decidimos evaluar la susceptibilidad de esta línea celular ante los adenovirus oncolíticos Adhz60 y Adhz63. Usamos como control positivo una línea celular humana tumoral HeLa la cual si es permisiva para la replicación de adenovirus y como control negativo la línea LCC-1 la cual, como TC-1, también pertenece a C57BL/6 y proviene de epitelio pulmonar, sin embargo no cuenta con los genes E6 y E7 del HPV-16. La línea LLC-1 tiene una mutación en los codones 32 y 334 de p53 (Ohashi et al., 1995).

Después de observar los cambios morfológicos (Figura 5), la lisis celular producida por el adenovirus (Figura 6) y la disminución de la sobrevivencia celular (Figura 7), demostramos que la línea celular tumoral murina TC-1 presentó un evidente efecto citopático asociado a la replicación del virus, de forma similar a la línea HeLa. Mientras que la línea LCC-1 mostró muy poco efecto citopático comparado a la línea TC-1.

Una vez demostrado el CPE producido, se decidió detectar la producción de proteínas virales en la línea celular TC-1. La expresión de las proteínas tempranas E1A (Figura 8) y la proteína tardía hexón (Figura 9) fueron detectadas de forma importante en la línea TC-1 mientras que en la línea LCC-1 se encontró una expresión muy disminuida.

Después de observar la buena expresión de proteínas virales y determinar si las partículas eran realmente activas se cuantificaron las partículas virales infectivas producidas por la línea celular TC-1 (Figura 10), la cual mostró ser 3 veces superior a la producida por la línea LCC-1. Sin embargo no llegó al grado de producción de la línea HeLa, la cual es 3 veces superior a la línea TC-1.

Un estudio (Ganly et al., 2000) demostró que algunas células epiteliales de roedor pueden ser permisivas a la replicación de adenovirus (Ad2) pero con baja eficiencia produciendo una cantidad 25 a 50 veces menos partículas virales comparada a una línea celular humana (A2780cp). La línea TC-1 en nuestro estudio mostró una eficiencia 3 veces menos comparada a la línea control HeLa. Sin embargo la metodología llevada a cabo no es la misma y al igual que este trabajo solo se ha limitado a estudios *in vitro*.

Este año se ha reportado el desarrollo de un modelo murino inmunocompetente empleando células murinas de adenocarcinoma de pulmón (ADS-12) en un ratón 129 (Zhang et al., 2015). En este modelo se demostró la infección adenoviral, la producción de E1A, la producción viral y una respuesta al tratamiento con el adenovirus oncolítico AdTAV-255. Al comparar nuestros resultados con este otro modelo, la viabilidad con MTT fue muy similar. El



efecto de citotoxicidad evaluado con tinción de cristal violeta, aunque parece muy similar el efecto del modelo de este investigador al nuestro, el método que realizaron incluye la incubación de mayor número de días con el virus (ellos 6 días y el nuestro 3 días) por lo que quizás esta diferencia favorecería el efecto citopático aparente en su resultado. Lo mismo ocurre en el caso del resultado del ensayo de viabilidad con MTT, en el que nuestros resultados son similares a los de este modelo, donde 10 MOI de los virus disminuyó hasta 70%-80% la viabilidad, sin embargo la metodología en el tiempo usado podría favorecer este efecto. El modelo desarrollado por este investigador no compara la producción de progenie viral entre las células murinas utilizadas y células humanas. En nuestro trabajo sí comparamos la producción viral de TC-1 con una línea tumoral humana. Parte fundamental en nuestro estudio incluye la evaluación de la línea TC-1 que contiene los genes E6 y E7 con otra línea murina que no los posee. con nuestros resultados obtenidos al parecer los genes E6 y E7 sí favorecen la replicación y producción de progenie viral. Sin embargo como perspectivas se encuentra el inhibir E6 y E7 en la línea TC-1 para observar directamente el papel que involucran estos genes en la replicación y producción de partículas virales.

Anteriormente ya se había demostrado la capacidad de inducir apoptosis por el virus Adhz60 en diversas líneas tumorales humanas (Kim et al., 2002, Rao et al., 2004), en este trabajo hemos demostrado que el Adhz60 conserva esta capacidad de inducir apoptosis en la línea TC-1 (Figuras 11 y 12). Por lo tanto el efecto de muerte celular está dado en parte por oncolisis viral y además por la inducción de apoptosis. Sin embargo, se requieren más estudios para

conocer cual es la proporción que participan cada uno de estos mecanismos en la muerte celular.

El éxito de la sucesiva destrucción de células tumorales depende de la replicación del virus y la liberación de partículas virales infectivas. Esta última siendo la mayor limitante para establecer un modelo murino inmunocompetente adecuado. Ya que aunque existen líneas celulares que son infectadas y producen las proteínas adenovirales, pero son incapaces de liberar partículas virales infectivas.

Debido a la falta de un modelo murino algunos investigadores también han usado un modelo de hámster sirio inmunocompetente, que aunque es efectivo para estudiar la replicación del virus, este es semipermisivo para la replicación adenoviral (Jiang et al., 2015) y se encuentra limitado por la accesibilidad a los reactivos para estudiar los parámetros del sistema inmune (Zhang et al., 2015). Otros modelos de organismos incluyen, la rata del algodón y cerdos, sin embargo, al igual que el hámster sirio carecen de la gran cantidad de herramientas para el estudio de la respuesta inmune disponibles en ratones (Zhang et al., 2015).

La respuesta inmune es probablemente la responsable de la falta de resultados positivos según estudios clínicos en pacientes con cáncer con administración sistémica de adenovirus (Kirn and Thorne, 2009) . El papel del sistema inmune es complejo y muy importante para el resultado terapéutico. La eficacia podría reducirse debido a la rápida eliminación viral como se ha descrito en los reovirus, o de lo contrario podría incrementarse debido a la

inducción de inmunidad específica (ej. Linfocitos T citotóxicos específicos de tumor) y no específica (ej. Factor de Necrosis Tumoral).

Se han desarrollado virus oncolíticos que contienen moléculas inmunomoduladoras (ej. Factor Estimulante de Colonia de Granulocitos – Macrófagos)(Miest and Cattaneo, 2014), por lo cual podría ser de utilidad evaluar estos adenovirus oncolíticos inmunomoduladores en un ratón silvestre; es decir, en un sistema de un modelo murino completamente inmunocompetente. Nuestro modelo podría ser usado para estudiar el efecto de la respuesta inmune del hospedero en tumores infectados por el vector, para determinar la seguridad y biodistribución de los adenovirus competentemente replicativos, simulando los efectos del sistema inmune en la limitación de la propagación viral a través del tumor y el potencial de virus inmunoestimuladores para inducir una respuesta inmune contra el cáncer.

Ningún modelo preclínico es una representación perfecta de los pacientes con cáncer. Existen muchas diferencias entre tumores humanos y murinos y entre hospederos humanos y murinos. Modelos de cultivos tisulares y modelos con xenotrasplantes son pobres representaciones del tejido tumoral. La expresión de los marcadores moleculares de unión al virus y la entrada en líneas celulares de cultivos tisulares, generalmente no corresponden a los observados en los tumores (Hallden et al., 2003). Sin embargo debido a que no es factible probar todos los agentes experimentales en pacientes, los modelos son necesarios para seleccionar cuales agentes deben ser usados en ensayos clínicos.

El valor predictivo de un modelo preclínico es difícil de evaluar antes de un ensayo clínico en pacientes. Sin embargo existen algunos factores que pueden ser usados para dar mayor peso a los resultados del modelo. Por ejemplo, si los resultados obtenidos son similares en varios modelos incluyendo modelos con diferentes tipos de tumor y con diferente fondo genético, los resultados podrían tener un mayor peso. Así como sí los resultados de un modelo dado refleja los obtenidos ya en algunos estudios en pacientes, esto incrementaría el peso del modelo (Hallden et al., 2003). La evaluación de modelos y su comparación con los resultados clínicos son necesarios para determinar las fortaleza y debilidad del modelo. No obstante nuestro modelo podría aportar datos adicionales que no estaban disponibles usando solamente ratones desnudos trasplantados con células tumorales humanas.

## Capítulo 6. CONCLUSIONES

---

1. La línea celular murina TC-1 es permisiva para la replicación del adenovirus oncolítico.
2. La línea celular murina TC-1 puede ser usada en un modelo murino inmunocompetente para la evaluación de adenovirus oncolíticos
3. El adenovirus oncolítico induce activación de la apoptosis en células TC-1.

## Capítulo 7. LITERATURA CITADA

---

- BABISS, L. E., GINSBERG, H. S. & DARNELL, J. E., JR. 1985. Adenovirus E1B proteins are required for accumulation of late viral mRNA and for effects on cellular mRNA translation and transport. *Mol Cell Biol*, 5, 2552-8.
- CABON, L., SRISKANDARAJAH, N., MUI, M. Z., TEODORO, J. G., BLANCHETTE, P. & BRANTON, P. E. 2013. Adenovirus E4orf4 protein-induced death of p53<sup>-/-</sup> H1299 human cancer cells follows a G1 arrest of both tetraploid and diploid cells due to a failure to initiate DNA synthesis. *J Virol*, 87, 13168-78.
- CAMPBELL, S. A. & GROMEIER, M. 2005. Oncolytic viruses for cancer therapy I. Cell-external factors: virus entry and receptor interaction. *Onkologie*, 28, 144-9.
- DUNCAN, S. J., GORDON, F. C., GREGORY, D. W., MCPHIE, J. L., POSTLETHWAITE, R., WHITE, R. & WILLCOX, H. N. 1978. Infection of mouse liver by human adenovirus type 5. *J Gen Virol*, 40, 45-61.
- FUEYO, J., ALEMANY, R., GOMEZ-MANZANO, C., FULLER, G. N., KHAN, A., CONRAD, C. A., LIU, T.-J., JIANG, H., LEMOINE, M. G., SUZUKI, K., SAWAYA, R., CURIEL, D. T., YUNG, W. K. A. & LANG, F. F. 2003. Preclinical Characterization of the Antiglioma Activity of a Tropism-Enhanced Adenovirus Targeted to the Retinoblastoma Pathway. *Journal of the National Cancer Institute*, 95, 652-660.

- FUEYO, J., GOMEZ-MANZANO, C., ALEMANY, R., LEE, P. S., MCDONNELL, T. J., MITLIANGA, P., SHI, Y. X., LEVIN, V. A., YUNG, W. K. & KYRITSIS, A. P. 2000. A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect in vivo. *Oncogene*, 19, 2-12.
- GANLY, I., MAUTNER, V. & BALMAIN, A. 2000. Productive replication of human adenoviruses in mouse epidermal cells. *J Virol*, 74, 2895-9.
- GARBER, K. 2006. China Approves World's First Oncolytic Virus Therapy For Cancer Treatment. *Journal of the National Cancer Institute*, 98, 298-300.
- GÓMEZ, J. & CURIEL, D. T. 2000. Conditionally replicative adenoviral vectors for cancer gene therapy. *The Lancet Oncology*, 1, 148-158.
- HALLDEN, G., HILL, R., WANG, Y., ANAND, A., LIU, T. C., LEMOINE, N. R., FRANCIS, J., HAWKINS, L. & KIRN, D. 2003. Novel immunocompetent murine tumor models for the assessment of replication-competent oncolytic adenovirus efficacy. *Mol Ther*, 8, 412-24.
- HITT, M. M., ADDISON, C. L. & GRAHAM, F. L. 1997. Human Adenovirus Vectors for Gene Transfer into Mammalian Cells. *In*: AUGUST, J. T. (ed.) *Advances in Pharmacology*. Academic Press.
- JIANG, H., CLISE-DWYER, K., RUISAARD, K. E., FAN, X., TIAN, W., GUMIN, J., LAMFERS, M. L., KLEIJN, A., LANG, F. F., YUNG, W.-K. A., VENCE, L. M., GOMEZ-MANZANO, C. & FUEYO, J. 2014. Delta-24-RGD Oncolytic Adenovirus Elicits Anti-Glioma Immunity in an Immunocompetent Mouse Model. *PLoS ONE*, 9, e97407.
- JIANG, H., GOMEZ-MANZANO, C., RIVERA-MOLINA, Y., LANG, F. F., CONRAD, C. A. & FUEYO, J. 2015. Oncolytic adenovirus research

- evolution: from cell-cycle checkpoints to immune checkpoints. *Curr Opin Virol*, 13, 33-39.
- JIANG, H., MCCORMICK, F., LANG, F. F., GOMEZ-MANZANO, C. & FUEYO, J. 2006. Oncolytic adenoviruses as antiglioma agents. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 6, 697-708.
- JOUNAIDI, Y., DOLOFF, J. C. & WAXMAN, D. J. 2007. Conditionally Replicating Adenoviruses for Cancer Treatment. *Current Cancer Drug Targets*, 7, 285-301.
- KIM, J., CHO, J. Y., KIM, J. H., JUNG, K. C. & YUN, C. O. 2002. Evaluation of E1B gene-attenuated replicating adenoviruses for cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther*, 9, 725-36.
- KIRN, D. H. & THORNE, S. H. 2009. Targeted and armed oncolytic poxviruses: a novel multi-mechanistic therapeutic class for cancer. *Nat Rev Cancer*, 9, 64-71.
- LEVINE, A. J., MOMAND, J. & FINLAY, C. A. 1991. The p53 tumour suppressor gene. *Nature*, 351, 453-6.
- LIN, K.-Y., GUARNIERI, F. G., STAVELEY-O'CARROLL, K. F., LEVITSKY, H. I., AUGUST, J. T., PARDOLL, D. M. & WU, T.-C. 1996. Treatment of Established Tumors with a Novel Vaccine That Enhances Major Histocompatibility Class II Presentation of Tumor Antigen. *Cancer Research*, 56, 21-26.
- MCCONNELL, M. J. & IMPERIALE, M. J. 2004. Biology of adenovirus and its use as a vector for gene therapy. *Hum Gene Ther*, 15, 1022-33.



- MCCORMICK, F. 2003. Cancer Specific Viruses and the Development of ONYX-015. *Cancer Biology & Therapy*, 2, 156-159.
- MIEST, T. S. & CATTANEO, R. 2014. New viruses for cancer therapy: meeting clinical needs. *Nat Rev Microbiol*, 12, 23-34.
- MILLER, C. R., BUCHSBAUM, D. J., REYNOLDS, P. N., DOUGLAS, J. T., GILLESPIE, G. Y., MAYO, M. S., RABEN, D. & CURIEL, D. T. 1998. Differential Susceptibility of Primary and Established Human Glioma Cells to Adenovirus Infection: Targeting via the Epidermal Growth Factor Receptor Achieves Fiber Receptor-independent Gene Transfer. *Cancer Research*, 58, 5738-5748.
- NEMEROW, G. R. 2002. Chapter 2 - Biology of Adenovirus Cell Entry. *In*: CURIEL, D. T. & DOUGLAS, J. T. (eds.) *Adenoviral Vectors for Gene Therapy*. San Diego: Academic Press.
- NEMUNAITIS, J. J. 1999. Cancer Treatment Involving Oncolytic Viruses. *Clinical Lung Cancer*, 1, 50-55.
- NORMAN, K. L., FARASSATI, F. & LEE, P. W. K. 2001. Oncolytic viruses and cancer therapy. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 12, 271-282.
- O'SHEA, C. C., JOHNSON, L., BAGUS, B., CHOI, S., NICHOLAS, C., SHEN, A., BOYLE, L., PANDEY, K., SORIA, C., KUNICH, J., SHEN, Y., HABETS, G., GINZINGER, D. & MCCORMICK, F. 2004. Late viral RNA export, rather than p53 inactivation, determines ONYX-015 tumor selectivity. *Cancer Cell*, 6, 611-623.

- OHASHI, M., SUGIKAWA, E. & NAKANISHI, N. 1995. Inhibition of p53 protein phosphorylation by 9-hydroxyellipticine: a possible anticancer mechanism. *Jpn J Cancer Res*, 86, 819-27.
- PHELPS, W. C., YEE, C. L., MÜNGER, K. & HOWLEY, P. M. 1988. The human papillomavirus type 16 E7 gene encodes transactivation and transformation functions similar to those of adenovirus E1A. *Cell*, 53, 539-547.
- RAO, L., DEBBAS, M., SABBATINI, P., HOCKENBERY, D., KORSMEYER, S. & WHITE, E. 1992. The adenovirus E1A proteins induce apoptosis, which is inhibited by the E1B 19-kDa and Bcl-2 proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89, 7742-7746.
- RAO, X. M., TSENG, M. T., ZHENG, X., DONG, Y., JAMSHIDI-PARSIAN, A., THOMPSON, T. C., BRENNER, M. K., MCMASTERS, K. M. & ZHOU, H. S. 2004. E1A-induced apoptosis does not prevent replication of adenoviruses with deletion of E1b in majority of infected cancer cells. *Cancer Gene Ther*, 11, 585-93.
- RUSSELL, S. J., PENG, K.-W. & BELL, J. C. 2012. Oncolytic virotherapy. *Nat Biotech*, 30, 658-670.
- SANDIG, V., YOUIL, R., BETT, A. J., FRANLIN, L. L., OSHIMA, M., MAIONE, D., WANG, F., METZKER, M. L., SAVINO, R. & CASKEY, C. T. 2000. Optimization of the helper-dependent adenovirus system for production and potency in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97, 1002-1007.

- STEINWAERDER, D. S., CARLSON, C. A. & LIEBER, A. 2001. Human papilloma virus E6 and E7 proteins support DNA replication of adenoviruses deleted for the E1A and E1B genes. *Mol Ther*, 4, 211-6.
- THOMAS, M. A., SPENCER, J. F., LA REGINA, M. C., DHAR, D., TOLLEFSON, A. E., TOTH, K. & WOLD, W. S. 2006. Syrian hamster as a permissive immunocompetent animal model for the study of oncolytic adenovirus vectors. *Cancer Res*, 66, 1270-6.
- TOMKO, R. P., XU, R. & PHILIPSON, L. 1997. HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 3352-6.
- WICKHAM, T. J., MATHIAS, P., CHERESH, D. A. & NEMEROW, G. R. 2000. Integrins  $\alpha\beta 3$  and  $\alpha\beta 5$  promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell*, 73, 309-319.
- ZHANG, L., HEDJIRAN, F., LARSON, C., PEREZ, G. L. & REID, T. 2015. A novel immunocompetent murine model for replicating oncolytic adenoviral therapy. *Cancer Gene Ther*, 22, 17-22.